

Rockshild

1963

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und der
Universität
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. K. Herzberg

Über Längenmessungen der Desoxyribonucleinsäure

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Zahnmedizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Warda Toba R o t h s c h i l d
aus
T e l - A v i v

Frankfurt am Main 1963



Dekan: Prof.Dr.med. W. Krücke

Referent: Prof.Dr.med. A.K. Kleinschmidt

Korreferent: Prof.Dr.med. E. Heinz

Mündliche Prüfung: 30. Juli 1963

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern
mit herzlichstem Dank gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Über Längenmessungen der Desoxyribonucleinsäure(DNA)

A	E I N L E I T U N G	Seite	1
	1. Chemische Bestandteile der Desoxyribo- nucleinsäure	"	1
	2. Struktur des DNA-Moleküls	"	3
	3. Hinweise zur biologischen Bedeutung der DNA	"	6
	4. Präparation der DNA	"	8
	5. Einige physikalisch-chemische Eigen- schaften der DNA	"	8
B	F R A G E S T E L L U N G	"	11
C	M E T H O D I K	"	12
	1. Bemerkungen zur Präparation der DNA	"	12
	2. Ultraschall-Behandlung	"	12
	3. Röntgenbestrahlung	"	12
	4. Spreiten der DNA	"	13
	5. Darstellung im Elektronenmikroskop	"	13
	6. Längenmessungen von DNA-Molekülen	"	15
D	R E S U L T A T E	"	17
E	D I S K U S S I O N	"	29
F	Z U S A M M E N F A S S U N G	"	31
G	L I T E R A T U R	"	32

A E I N L E I T U N G

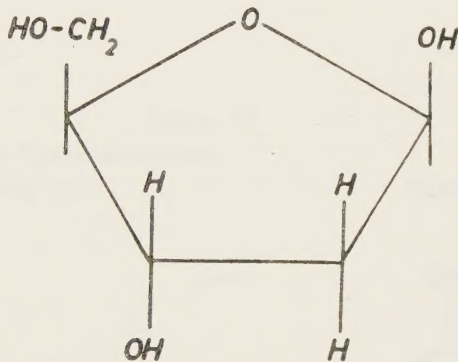
1. Chemische Bestandteile der Desoxyribonucleinsäure(DNA)

In Kernen von Eiterzellen hat MIESCHER eine Substanz nachgewiesen, die neben Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff auch Phosphor enthält (1). Sie wurde von ALTMANN Nucleinsäure genannt (2).

Die weitere Erforschung mit chemischen und physikalischen Methoden brachte eine weitgehende Klarheit über die Zusammensetzung und den Aufbau der Nucleinsäuremoleküle.

Alle Nucleinsäuren zeigen in der Analyse folgende Komponenten (3):

a) Desoxyribose, Abb. 1, (In der Desoxyribonucleinsäure = DNA)



DESOXYRIBOSE

(Abb. 1)

oder

Ribose (In der Ribonucleinsäure = RNA),

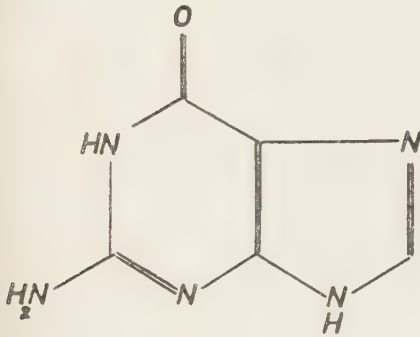
- b) Orthophosphat (siehe Abb. 4) und
- c) heterozyklische Basen.

Bei den Basen gibt es verschiedene Möglichkeiten.

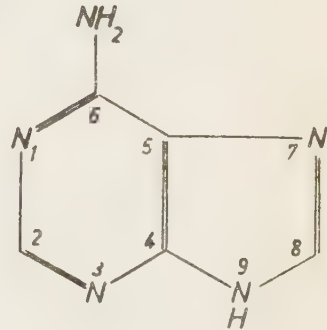
Man findet die Purinbasen,

Guanin (G)

Adenin (A)



GUANIN



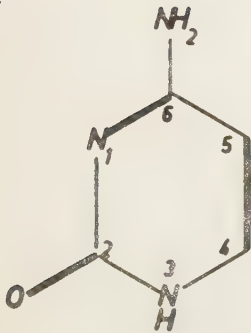
ADENIN

(Abb. 2)

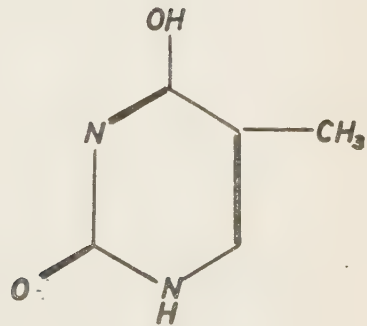
und die Pyrimidinbasen

Cytosin (C)

Thymin (T)



CYTOSIN



THYMIN

(Abb. 3)

und Uracil (U).

Thymin befindet sich nur in der DNA, Uracil nur in der RNA.

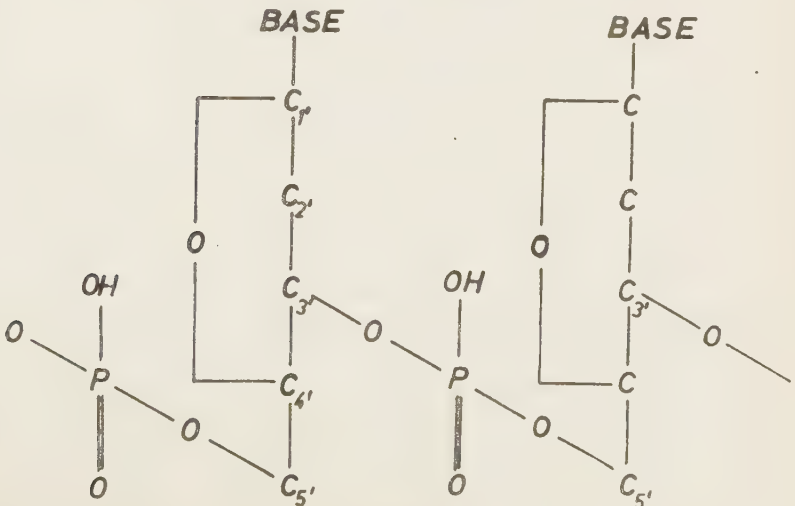
In T_{gerade}-Phagen von Escherichia coli kann Cytosin durch Hydroxymethylcytosin ersetzt sein. Weitere mögliche Bestandteile sind von geringerer Bedeutung: z.B. Aminopurine und Glucose.

2. Struktur des DNA-Moleküls

Unter Verwendung von röntgenographischen Struktur-Untersuchungen haben WATSON UND CRICK (4), WATSON, CRICK UND WILKINS (5) ein Modell für DNA abgeleitet, das sich für DNA verschiedener Herkunft gut bewährt hat.

Danach hat man sich den Aufbau des Makromoleküls folgendermaßen vorzustellen:

Die Desoxyribosen sind untereinander durch Orthophosphat, dessen Valenzen alternierend an der C_{3'}- und C_{5'}-Position am Zucker angreifen, zu langen Ketten polymerisiert, sie bilden so das Rückgrat für diese linearen Makromoleküle.



(Abb. 4)

Die C_1' -Position des Zuckers ist mit einer der verschiedenen Basen verbunden. Je einer solchen Kette steht eine komplementäre Kette gegenüber, beide sind zu einer Doppelhelix umeinander gewunden (Abb. 5).

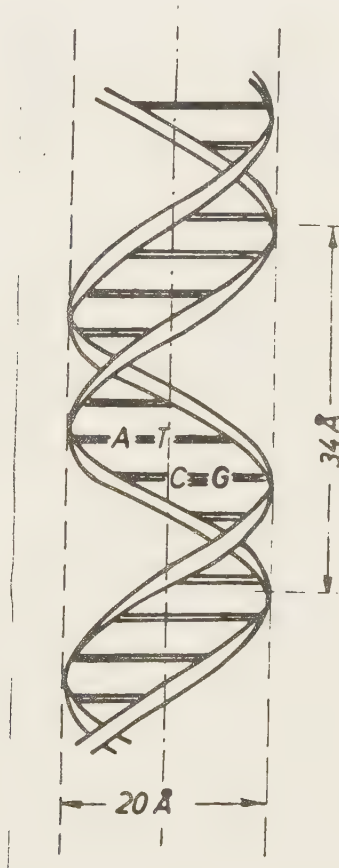


Abb. 5 DNA-Doppelhelix (B-Konfiguration)

Jeweils zwei Basen stehen sich dabei gegenüber und sind durch Wasserstoffbrücken aneinander gebunden. Wesentlich ist jedoch, daß sich aus räumlichen Gründen nur A und T oder C und G gegenüber stehen können. Zwischen A und T werden zwei, zwischen C und G drei Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Aus den Röntgendaten folgt, daß die Abmessungen der DNA-Zwillingsmoleküle von ihrem Wassergehalt abhängen. In der B-Konfiguration (4) ist die Ganghöhe der Doppelhelix $34 \text{ \AA}$ und der Durchmesser $20 \text{ \AA}$ (siehe Abb. 5).

Die Kombination Phosphat-Zucker-Base nennt man Mononucleotid, ein DNA-Stück von $34 \text{ \AA}$ enthält 20 Mononucleotide oder 10 Dinucleotide. Da die Dinucleotide, gleichgültig, ob sie A und T oder C und G enthalten, fast dasselbe Molekulargewicht haben, kann man ein Molekulargewicht der DNA pro Längeneinheit angeben, unabhängig davon, wie groß das Verhältnis

$$\frac{[A] + [T]}{[C] + [G]}$$

der molaren Basenkonzentrationen ist: es ergibt sich etwa $200 \text{ pro \AA}$ für Natrium-DNA.

3. Hinweise zur biologischen Bedeutung der DNA

Bekanntlich ist die DNA der Träger der Information für die Lebensprozesse der Zelle, wie Zellwachstum und -vermehrung, während die RNA bei der Realisierung der Information wirksam ist. Das haben zahlreiche Versuche, besonders auf dem Gebiet der Bakteriengenetik, bewiesen.

AVERY, MACLEOD UND MCCARTY (6) haben gezeigt, daß eine spezielle Eigenschaft (Fähigkeit zur Kapselbildung) eines Pneumokokkenstammes durch dessen gereinigte DNA auf einen anderen Stamm übertragen werden kann, der diese Eigenschaft vorher nicht besaß. Dieser Vorgang heißt Transformation. Auch eine direkte Übertragung von Genfunktionen von einer zur anderen Bakterienzelle (Konjugation) konnte nachgewiesen werden. Schließlich sei auch die Transduktion erwähnt, bei der die Übertragung der DNA bzw. der Genfunktionen mittels bestimmter Bakteriophagen bewerkstelligt wird.

Wenn sich die Zelle teilt, teilt sich auch die DNA (7) unter gleichzeitiger Verdoppelung (Replikation), so daß die Informationen auch an die nachfolgende Generation weitergegeben werden. Dadurch ist die Konstanz der Zelleigenschaften über lange Zeiträume gewährleistet, die nur gelegentlich durch Mutationen (spontane und erbliche Änderungen von Eigenschaften) unterbrochen wird.

Die molekulare Interpretation dieser angeführten Erscheinungen haben WATSON UND CRICK (4) mit

ihrem DNA-Modell gegeben. Danach ist die Information durch die Aufeinanderfolge (Sequenz) der Basenpaare A und T oder C und G längs der Doppelhelix festgelegt. Bei der DNA-Reduplikation werden die Wasserstoffbrücken in den Basenpaaren geöffnet, die beiden Stränge gehen auseinander. Diese werden gleichzeitig durch Synthese je eines neuen Stranges wieder ergänzt, und zwar genau mit der komplementären Basensequenz, weil einem Thymin bzw. Cytosin nur ein Adenin bzw. Guanin gegenüber stehen kann.

Bei doppelsträngiger DNA gilt in Übereinstimmung mit dem Experiment für die molaren Konzentrationen stets

$$[A] = [T], \quad [C] = [G];$$

das nach Säurehydrolyse chromatographisch meßbare Verhältnis

$$\frac{[A] + [T]}{[C] + [G]} \quad \text{hängt jedoch}$$

von der Art der Organismen ab und kann zwischen 0,3 und 2,3 (und noch höher) liegen (8).

Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, für ein natürliches DNA-Molekül die vollständige Basensequenz oder längere Strecken davon anzugeben.

Erst in neuerer Zeit wurde gefunden, daß native DNA ein extrem hohes Molekulargewicht hat. So enthalten T₂-Bakteriophagen ein DNA-Molekül (nach chemischer Bestimmung) von etwa $130 \cdot 10^6$ Molekulargewicht (vgl. BURTON (9)). Auch bei Bakterien nimmt man an, daß sie ein einziges oder nur wenige DNA-Moleküle enthalten, mit Molekulargewichten größer als $6 \cdot 10^8$ (Micrococcus Lysodeiktikus, (10)).

4. Präparation der DNA

DNA ist in den Zellkernen mit anderen Substanzen (z.B. Protamin, Histon (11)) in nicht stöchiometrischer Weise verbunden, deren Abtrennung, z.B. durch grenzflächenaktive Stoffe, wie Dodecylsulfat (MARKO UND BUTLER (12), KIEFER, KIEFER, ZAHN UND ZAHN (13)) oder mit der Phenolmethode nach GIERER UND SCHRAMM (14) und andere Präparationsschritte bei der DNA einen Abbau der im nativen Zustand sehr langen DNA-Moleküle durch Querbrüche bewirken. Das ist auch zu erwarten, weil die nativen DNA-Moleküle außerordentlich lang sind im Vergleich zu ihrem Durchmesser (z.B. 500 000 Å zu 20 Å bei T₂-Bakteriophagen).

Daher kann ein bei der Präparation unvermeidliches Strömungsgefälle leicht eine so hohe Zugspannung für das DNA-Molekül bedeuten, daß an einer Stelle zwei nebeneinander liegende Valenzbindungen aufgehen (Querbrüche). So führten die im Laufe der Jahre im Sinne einer mechanischen Schonung der DNA verbesserten Präparationsmethoden zu immer höheren mittleren Molekulargewichten (vgl. ZAHN u.a. (15)). Aber auch heute ist es noch nicht möglich, in größerer Menge hochgereinigte native DNA darzustellen.

5. Einige physikalisch-chemische Eigenschaften der DNA

DNA-Moleküle unterscheiden sich, abgesehen von den Basensequenzen, im wesentlichen

- a) durch ihre Dichte,
- b) durch ihre Schmelztemperatur,
- c) durch ihre Länge (bzw. Molekulargewicht) und
- d) durch ihre Längenverteilung.

Dichte und Schmelztemperatur hängen vom Verhältnis

$$\frac{[\text{A}] + [\text{T}]}{[\text{C}] + [\text{G}]} \quad \text{ab, während}$$

die Längenverteilung im allgemeinen präparationsbedingt ist. Die Dichte kann in der Ultrazentrifuge mit Hilfe eines geeigneten Dichtegradienten bestimmt werden. Im Gleichgewicht, nach hinreichend langer Laufzeit, sammelt sich die gelöste DNA an der Stelle der Lösungsschicht, welche die gleiche Dichte wie diese DNA hat (vgl. MESELSOHN, STAHL UND VIINOGRAD (7)). Die Schmelztemperatur wird durch die Ultraviolett-Absorption einer DNA-Lösung bei etwa 260 m μ als Funktion der Temperatur ermittelt: beim Schmelzen, d.h. Aufgehen der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen der Doppelhelix erhöht sich die Absorption bis etwa 40 % (16, 17).

Die mittlere Länge (bzw. Molekulargewicht) kann indirekt aus mehreren Eigenschaften der DNA in Lösung ermittelt werden, die von der molekularen Länge abhängig sind: aus der Viskosität, der Sedimentation, dem Streuvermögen gegenüber Licht und der Strömungsdoppelbrechung. Dabei sind bis zu einem gewissen Grade auch Längen- bzw. Molekulargewichtsverteilungen bestimmbar (18, 19).

Eine direkte Messung der Längenverteilung ist bisher nur nach zwei Methoden möglich; erstens kann in die DNA von Bakteriophagen oder Bakterien während ihrer Vermehrung radioaktiver Phosphor (P³²) oder Tritium (H³) quantitativ eingebaut werden. Mit Hilfe autoradiographischer Methoden läßt sich dann durch Auszählen der β -Strahlen-Bahnspuren auf die Länge bzw. das Molekulargewicht einzelner

DNA-Moleküle schließen (20, 21, 22). Zweitens sind die Längen einzelner DNA-Moleküle bei geeigneter Präparation in elektronenmikroskopischen Aufnahmen meßbar. So haben HALL UND DOTY (23) nach der Methode von HALL UND LITT (24) eine mit Schall behandelte DNA-Lösung auf Glimmeroberflächen aufgenebelt und elektronenmikroskopisch einzelne Moleküle sichtbar gemacht. Deren Längenverteilung (= Anzahl Moleküle pro Längeneinheit als Funktion der Länge) hatte die Form einer Exponentialfunktion, wie sie für sehr lange Ausgangsmoleküle gilt, die durch zufällig verteilte Querbrüche abgebaut sind. KLEINSCHMIDT UND ZAHN (25), KLEINSCHMIDT (26) sowie LANG u.a. (27) haben DNA und das basische Protein Cytochrom c als quasi zweidimensionalen Mischfilm auf wässriger Oberfläche gespreitet und an elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Längenverteilung gemessen.

B F R A G E S T E L L U N G

In der Einleitung wurde kurz dargelegt, daß die bei der Untersuchung einer für die Lebensvorgänge so wichtigen Substanz wie DNA notwendige Isolierung i.a. zu DNA-Lösungen führt, die durch Querbrüche erheblich abgebaut sind (Desintegration). Es ist daher von Interesse,

1. welche Form die DNA-Längenverteilung solcher Präparationen hat,
2. ob die DNA-Moleküle an bestimmten Stellen für Querbrüche schwache Stellen haben und
3. welchen Einfluß eine gewollte Desintegration auf die Längenverteilung hat.

In den folgenden Abschnitten werden Längenmessungen an zwei DNA-Präparationen beschrieben, die zum Teil mit Ultraschall oder mit Röntgenstrahlen behandelt wurden. Zuvor war eine elektronenmikroskopische Darstellung durch Spreitung einer DNA-Proteinlösung auf wässriger Oberfläche, mit anschließender Übertragung auf geeignete Objektträger, vorangegangen.

C M E T H O D I K

1. Bemerkungen zur Präparation der DNA

Das verwendete Seelachs-DNA-Präparat war aus Seelachsgonaden hergestellt (KLEINSCHMIDT UND ZAHN (25)), die Forellen-DNA von der Firma Mack, Illertissen, geliefert. Beide haben als Flocken im getrockneten Zustand vorgelegen ^x).

2. Ultraschall-Behandlung

Mit einem Gerät nach KEHLER u.a. (28) wurde eine 0,08 %ige DNA-Lösung in 0,03 % NaCl 30 Min. bei 1 MHz (maximale Intensität) im Wasserbad beschallt. Durch Kühlung blieb die Temperatur unter 40⁰ C.

3. Röntgenbestrahlung

Eine 0,0018 %ige DNA-Lösung in 0,1 m NaCl wurde mit einer Dosis von etwa 2 kr bestrahlt ^{xx}).

^x) Herr Prof. Dr. Zahn, Universität Frankfurt am Main stellte in dankenswerter Weise die Präparate zur Verfügung.

^{xx}) Dem Max-Planck-Institut für Biophysik (Direktor: Prof. Dr. B. Rajewsky) möchte ich für die Ausführung der Bestrahlung herzlich danken.

4. Spreden der DNA (KLEINSCHMIDT (25))

DNA-Lösungen mit etwa 0,01 % Cytochrom c in 1 m Ammoniumacetat wurden so hergestellt, daß das Konzentrationsverhältnis DNA : Cytochrom c etwa 1:20 bis 1:50 war. 0,25 ml dieser Lösung wurden langsam aus einer Spritze mit Mikrometertrieb auf eine schwach geneigte Rampe (benetzter Glasobjektträger) gebracht. Von dort lief die Lösung in die reine Oberfläche einer 0,15 m Ammoniumacetat-Lösung ab, welche einen LANGMUIR-Trog von 60 x 10 x 1 cm füllte. Dabei entsteht ein monomolekularer Oberflächenfilm von denaturiertem Cytochrom c, der DNA-Moleküle enthält. Eine Kompression des Films mit einer Barriere (meßbar mit einer Oberflächenwaage) diente zum Schließen von Lücken und zur Verfestigung des Films.

5. Darstellung im Elektronenmikroskop

Auf elektronenmikroskopische Objektblenden (7 - Loch-Blenden aus Pt/Au, bedeckt mit kohlebedampften Formvarfolien) wurde der Film durch Abtupfen übertragen. Der hängenbleibende Tropfen wird entfernt, indem man die Blende 30 Sek. in die Oberfläche von Äthanol bringt, dieses wird dann durch 10 Sek. Einbringen in Isopentan verdrängt. Sofort anschließend wurden die Objekte im Hochvakuum unter flachem Winkel (6°) mit Platin kegelbedampft (29), (4,5 cm Pt-Draht, 0,1 mm $\varnothing$, Abstand zum Objekt 13 cm).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen^{x)}
(Elmiskop I, Siemens & Halske) wurden bei einer
Vergrößerung von 10 000 auf Perutz-Kontrast-
Platten 6,5 x 9 cm hergestellt.

^{x)} Die Arbeiten am Elektronenmikroskop wurden von
Frl. W. Hellmann durchgeführt, mit Unterstützung
der Deutschen Forschungsgemeinschaft ebenso die
Spreitungen der DNA-Protein-Lösungen, wofür ihr
besonders gedankt sei.

6. Längenmessungen von DNA-Molekülen (Eigene Versuche)

Die photographischen Platten wurden nun auf eine mit weißem Karton bespannte Holzwand projiziert (Abb. 6). Die Vergrößerung ergab sich mit Hilfe einer ebenfalls projizierten Zentimeterskala. Der Karton war zur leichteren Orientierung in 15 Felder unterteilt.

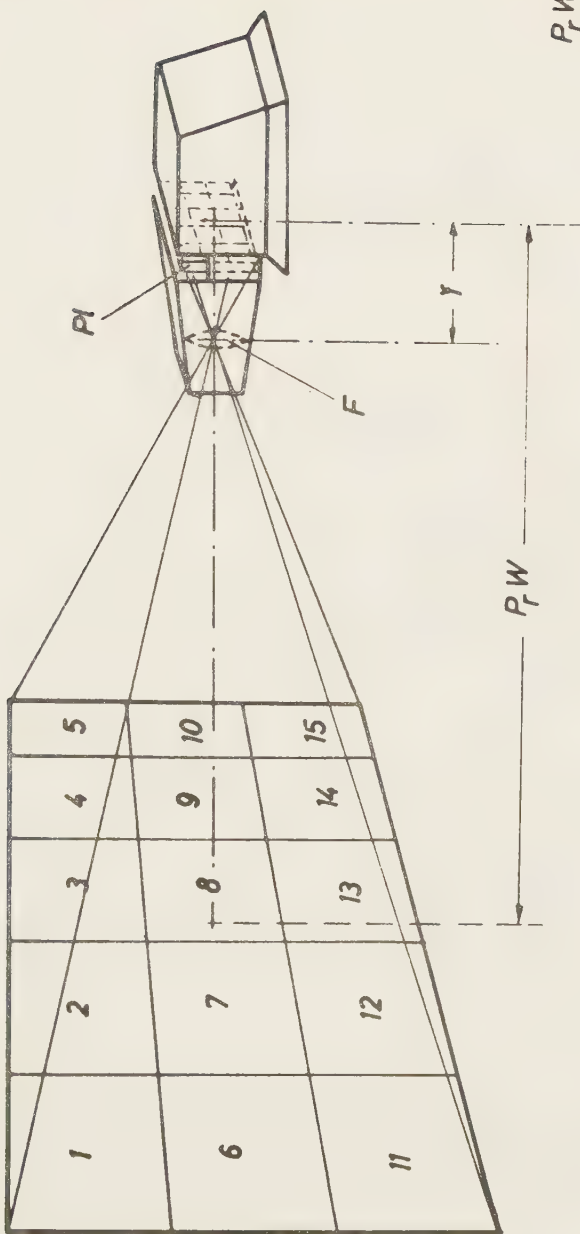
Die Längen der durch die Kegelbedampfung gut und lückenlos sichtbaren DNA-Fäden wurden mit einem Kurvenmesser (sog. Kilometerzähler) durch Abfahren auf der Projektionswand in cm bestimmt (1 Skalenteil: 1 cm). Durch Division mit der Gesamtvergrößerung ergibt sich die wahre Länge des DNA-Fadens (25).

Die Fehler der Längenmessungen sind gegeben durch

- a) die elektronenmikroskopische Vergrößerung mit etwa $\pm 3 \%$,
- b) die Projektionsvergrößerung mit etwa $\pm 1 \%$,
- c) die Ablesungenauigkeit des Nullpunktes und des Meßwertes am Kurvenmesser von zusammen $\pm 0,2$ cm; das bedeutet bei einer Fadenlänge von 10 cm: $\pm 2 \%$,
- d) den Anfang und das Ende eines Fadens (angelagerte Pt-Kriställchen) mit etwa $\pm 1 \%$ (geschätzt) und
- e) durch subjektive Fehler beim Abfahren des in der Projektion etwa 4 mm breiten Fadenbildes mit etwa $\pm 1 \%$ (geschätzt).

Die Summe dieser Fehler ergibt $\pm 8 \%$.

Bei der Ermittlung von Molekulargewichten aus der Länge kommt noch der Fehler des Umrechnungsfaktors hinzu.



$P_W = 4m$
 $f = 20cm$

Vergrößerung

1. 25,2 - fach
2. 20 - fach

(Abb. 6)

D R E S U L T A T E ^{x)}

Die in cm auf der Projektionswand gemessenen DNA-Molekül-Längen wurden in Längenintervalle von bestimmter Breite zusammengefaßt, d.h. es wurde angegeben, wieviel Moleküle (n_i) eine Länge zwischen

$$l_i - \frac{\Delta l}{2} \quad \text{und} \quad l_i + \frac{\Delta l}{2}$$

haben.

Der Zahlenwert der hier konstanten Intervalle Δl darf nicht zu klein und nicht zu groß sein. Im ersten Fall ist dann n_i zu klein und der statistische relative Fehler von n_i wird zu groß: dieser ist nämlich $\pm 1/\sqrt{n_i}$ und steigt mit fallendem n_i . Man kann die Meßpunkte dann nicht zu einer sinnvollen Kurve verbinden. Im zweiten Fall wird die Längenverteilung zu sehr vergrößert. Es wurde daher für jedes der drei DNA-Präparate ein Optimum für Δl gesucht:

1. Seelachs-DNA: $\Delta l = 2 \text{ cm}$
2. Forellen-DNA, beschallt: $\Delta l = 0,5 \text{ cm}$ und
3. Forellen-DNA, röntgenbestrahlt: $\Delta l = 0,5 \text{ cm}$.

In den Tabellen 1 - 3 sind zu den Zentralwerten l_i der Längenintervalle die zugehörigen Molekülanzahlen n_i angegeben, sowie die Produkte $n_i \times l_i$, die zur Berechnung der mittleren Länge notwendig sind.

^{x)} Für die Mitarbeit bei der statistischen Auswertung sage ich Herrn Dr. D. Lang, Hygiene-Institut, Univ. Frankfurt am Main, meinen aufrichtigen Dank.

T a b e l l e 1

Seelachs-DNA

Längenintervall von $l_1 - \frac{\Delta l}{2}$ bis $l_1 + \frac{\Delta l}{2}$, $\Delta l = 2$ cm

Länge l_1 cm	Molekülanzahl n_1 im Längenintervall Δl	$n_1 \cdot l_1$ cm
0,5	186	93
2,5	601	1 502
4,5	583	2 624
6,5	472	3 068
8,5	361	3 068
10,5	235	2 468
12,5	173	2 162
14,5	101	1 464
16,5	75	1 238
18,5	64	1 184
20,5	54	1 107
22,5	31	698
24,5	16	392
26,5	15	397
28,5	14	399
30,5	11	336
32,5	9	292
34,5	1	34
36,5	2	73
38,5	3	116
40,5	1	40
42,5	1	42
44,5	0	0
46,5	0	0
48,5	0	0
50,5	1	50
	$\sum_i n_1 = 3\ 010$	$\sum_i n_1 \cdot l_1 = 22\ 847$

$$I = \frac{\sum_i n_1 l_1}{\sum_i n_1} = \frac{22\ 847}{3\ 010} = 7,59 \text{ cm}$$

T a b e l l e 2

Forellen-DNA, beschallt

Längenintervall von $l_i - \frac{\Delta l}{2}$ bis $l_i + \frac{\Delta l}{2}$, $\Delta l = 0,5$ cm

Länge l_i cm	Molekülanzahl n_i im Längenintervall Δl	$n_i \cdot l_i$ cm
0,3	218	65,4
0,8	615	492,0
1,3	425	552,5
1,8	311	559,8
2,3	199	457,7
2,8	122	341,6
3,3	106	349,8
3,8	73	277,4
4,3	42	138,6
4,8	41	196,8
5,3	19	100,7
5,8	21	121,8
6,3	19	119,7
6,8	5	34,0
7,3	5	36,5
7,8	5	39,0
8,3	4	33,2
8,8	2	17,6
9,3	3	27,9
9,8	2	19,6
10,3	1	10,3
10,8	1	10,8
11,3	0	0
16,8	1	16,8
	$\sum_i n_i = 2\ 240$	$\sum_i n_i l_i = 4\ 019,5$

$$I = \frac{\sum_i n_i l_i}{\sum_i n_i} = \frac{4\ 019,5}{2\ 240} = 1,79 \text{ cm}$$

T a b e l l e 3

Forellen-DNA, mit 2 krröntgenbestrahlt.

Längenintervall von $l_1 - \frac{\Delta l}{2}$ bis $l_1 + \frac{\Delta l}{2}$, $\Delta l = 0,5$ cm

Länge l_1 cm	Molekülanzahl n_1 im Längenintervall Δl	$n_1 \cdot l_1$ cm
0,3	43	12,9
0,8	158	126,4
1,3	133	172,9
1,8	99	178,2
2,3	107	246,1
2,8	64	179,2
3,3	56	184,8
3,8	56	212,8
4,3	46	197,8
4,8	45	216,0
5,3	34	180,2
5,8	28	162,4
6,3	19	119,7
6,8	15	102,0
7,3	11	80,3
7,8	8	62,4
8,3	8	66,4
8,8	4	35,2
9,3	7	65,1
9,8	4	39,2
10,3	8	82,4
10,8	1	10,8
11,3	2	22,6
11,8	2	23,6
12,3	0	0
12,8	1	12,8
13,3	2	26,6
13,8	1	13,8
14,3	1	14,3
14,8	0	0
15,3	1	15,3
15,8	0	0
17,8	1	17,8
28,3	1	28,3
	$\sum_i n_1 = 966$	$\sum_i n_1 l_1 = 2\ 908,3$

$$I = \frac{\sum_i n_1 l_1}{\sum_i n_1} = \frac{2\ 908,3}{966} = 3,01 \text{ cm}$$

Die mittleren Längen $\bar{l}$ ergeben sich aus der Formel

$$\bar{l} = \frac{\sum_i n_i l_i}{\sum_i n_i}$$

und sind in den Tabellen ebenfalls angegeben.

In den Abb. 7 - 12 sind die Werte graphisch dargestellt. Abszisse ist die Moleküllänge l_i , Ordinate ist die Anzahl n_i der Moleküle im Längenintervall $l_i - \frac{\Delta l}{2}$ bis $l_i + \frac{\Delta l}{2}$, entweder linear (Abb. 7,9,11) oder logarithmisch eingeteilt (Abb. 8,10,12). Alle drei DNA-Präparate haben eine sehr breite Längenverteilung mit einem weit links liegenden Maximum. Die Darstellungen mit logarithmisch geteilter Ordinate zeigen, daß man die Meßpunkte, abgesehen von Werten bei sehr kleinen l_i , durch eine Gerade verbinden kann. Um jede dieser Geraden wurde ein Fehlerbereich eingezeichnet (gestrichelt), um die Genauigkeit anschaulich abschätzen zu können: es wurde zu mehreren Ordinatenwerten auf der Geraden der absolute statistische Fehler $\pm \sqrt{n}$ addiert bzw. subtrahiert. Man sieht, daß die Meßpunkte (Kreise) innerhalb oder nicht wesentlich außerhalb dieses Bereiches liegen.

In Tabelle 4 werden die erhaltenen Werte zusammengefaßt:

T a b e l l e 4

Präparat	Gesamtver- größerung V	$\Delta 1$	mittl. Länge I	wahre mittl. Länge $= \frac{I}{V}$	mittl. Molekul.- Gewicht $\bar{M} = \frac{I}{V} \cdot 2,0 \cdot 10^{10}$
		cm	cm	10^{-4} cm	
Seelachs- DNA	258 000	2	7,59	0,294	$5,88 \cdot 10^5$
Forellen- DNA beschallt	205 000	0,5	1,79	0,087	$1,75 \cdot 10^5$
Forellen- DNA röntgen- bestrahlt	197 000	0,5	3,01	0,153	$3,06 \cdot 10^5$

Die wahre mittlere Länge (4. Spalte) ergibt sich aus I, dividiert durch die Gesamtvergrößerung V (elektronenmikroskopische Vergrößerung x Projektionsvergrößerung).

In der letzten Spalte sind die mittleren Molekulargewichte angegeben, wobei für 1 Å DNA-Molekül ein Molekulargewicht von $200/\text{Å}$ vorausgesetzt wurde (vgl. Einleitung).

Moleküle pro
Längenintervall

Abb. 7

SEELACHS-DNA

500

0 0

Länge

cm

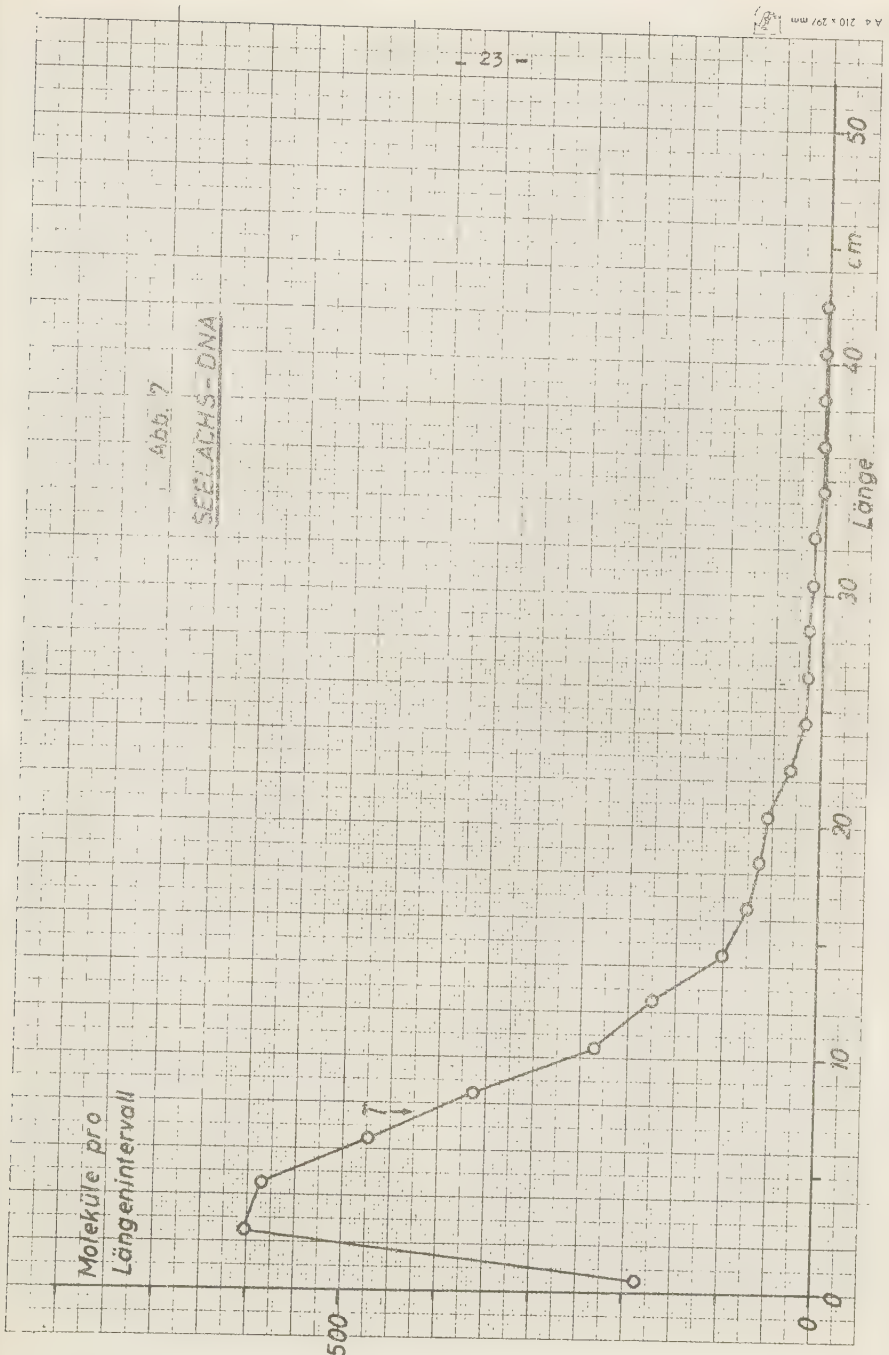
50

40

30

20

10



1000

9

8

7

6

5

4

3

2

1

0

-1

-2

-3

-4

-5

-6

-7

-8

-9

-10

100

9

8

7

6

5

4

3

2

1

0

-1

-2

-3

-4

-5

-6

-7

-8

-9

-10

Moleküle pro Längenintervall

Abb. 8

SEELACHS-DNA



Abb. 9

FORELLEN - DNA

Ultraschall

Moleküle pro
Längenintervall

Länge

cm

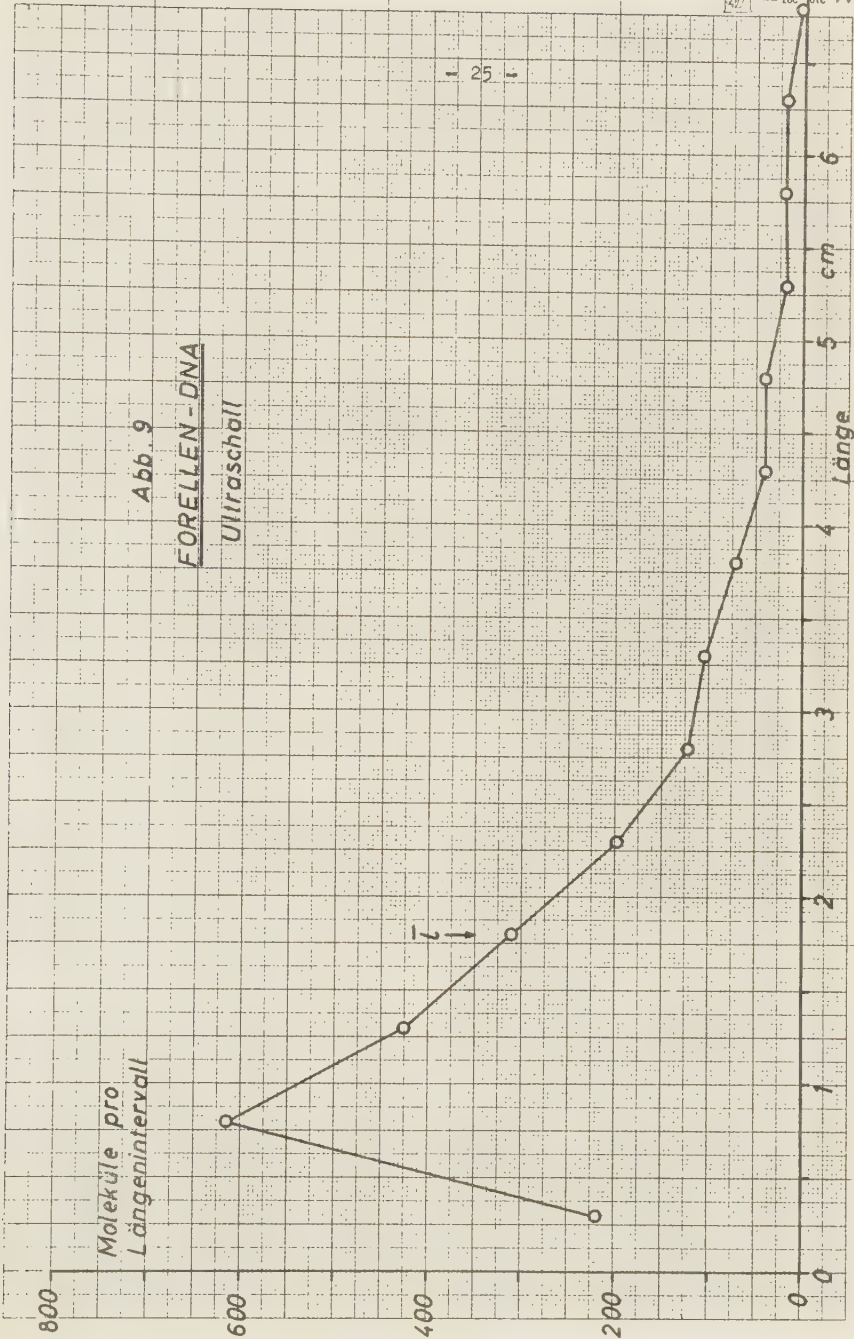


Abb. 10

FORELLEN DNA
Ultraschall

1000

100

Moleküle pro Längenintervall

Länge

5

cm

4

3

2

1

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

Abb. 11

FORELLEN - DNA
Röntgenbestrahlung

Moleküle pro
Längenintervall

Länge

cm

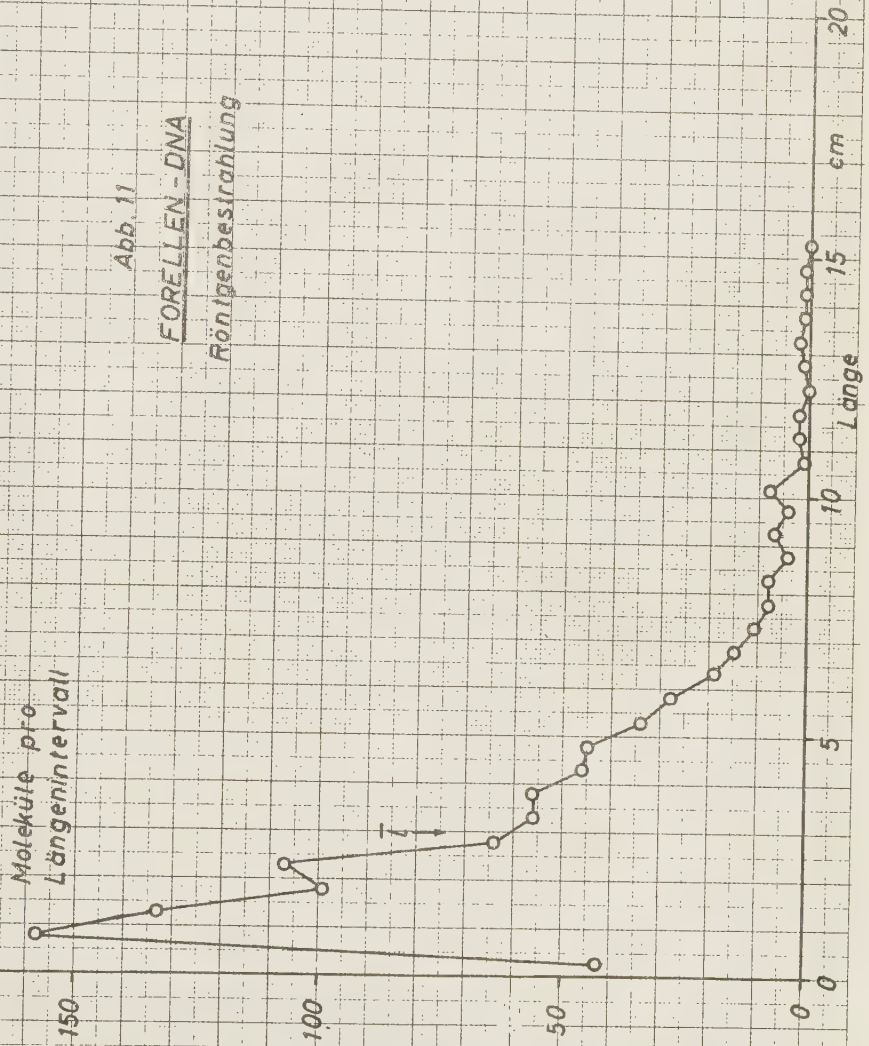


Abb 12

FORELLEN-DNA

Röntgenbestrahlung

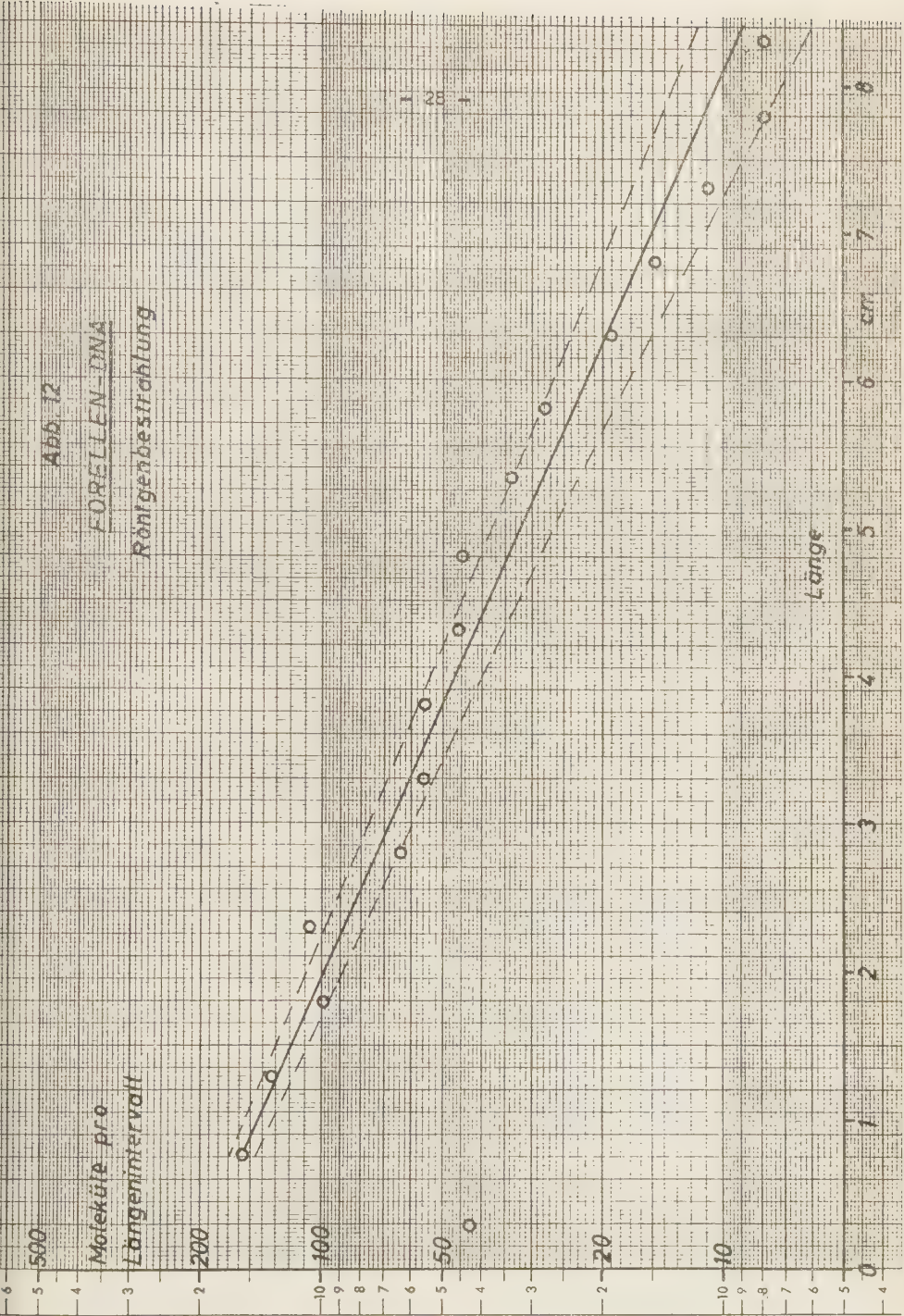
Moleküle pro

Längenintervall

Länge

cm

28



E D I S K U S S I O N

Im Hinblick auf die Fragestellung (Abschnitt B) kann man aufgrund der Resultate (Abschnitt D) folgende Schlüsse ziehen:

1. Eine bei der Präparation und Aufbewahrung im getrockneten Zustand durch Querbrüche abgebaute DNA (Seelachs-DNA) hat eine Längenverteilung, die in der Darstellung mit linearer Abszisse und logarithmischer Ordinate die Form einer fallenden Geraden besitzt (außer bei sehr kleinen Molekülen). Die Molekülanzahl pro Längenintervall nimmt also exponentiell mit der Länge ab. Das bedeutet nach HALL UND DOTY (23), daß die Querbrüche in den DNA-Molekülen statistisch, d.h. zufällig verteilt sind.
2. Innerhalb der statistischen und Meßfehler des angewandten Verfahrens können keine für Querbrüche bevorzugten Stellen im DNA-Molekül nachgewiesen werden.
3. Wie bekannt ist, bewirken Schall (HALL UND DOTY (23)) und Röntgenstrahlen einen DNA-Abbau durch Querbrüche. Wie die Abb. 9 - 12 zeigen, sind die resultierenden Längenverteilungen von gleichem Typ wie bei der nicht behandelten DNA: die Querbrüche sind statistisch über das Ausgangsmolekül verteilt, bevorzugte Bruchstellen sind nicht erkennbar. Dagegen

hat die mittlere Länge $\bar{I}$ gegenüber dem Ausgangspräparat erheblich abgenommen. Nach Messungen von LANG u.a. (27) hatte die unbehandelte Forellen-DNA eine mittlere Moleküllänge von etwa $2 \cdot 10^{-4}$ cm. Daher ist die mittlere Länge nach Ultrabeschallung auf $1/23$ und nach Röntgenstrahlen auf $1/13$ erniedrigt worden.

F Z U S A M M E N F A S S U N G

Nach einer kurzen Beschreibung von Aufbau, Eigenschaften und biologischer Bedeutung von Desoxyribonucleinsäure (DNA) wird über die Messung der molekularen Längenverteilung von 2 DNA-Präparationen berichtet. Die Längenmessungen werden durch Spreiten von DNA-Protein-Lösungen auf wässriger Oberfläche mit nachfolgender elektronenmikroskopischer Darstellung ermöglicht. Es wird gezeigt, daß die Häufigkeit der Moleküle mit wachsender Länge exponentiell abnimmt. Daraus wird geschlossen, daß der DNA-Abbau während der Reindarstellung durch Querbrüche erfolgt, die statistisch über die Moleküllänge verteilt sind. Bevorzugte Bruchstellen konnten nicht nachgewiesen werden. Ultrabeschallte und röntgenbestrahlte DNA-Lösungen zeigen Längenverteilungen vom gleichen Typ wie unbehandelte DNA, jedoch mit erniedrigter mittlerer Moleküllänge. Auch hier erfolgt der Abbau durch statistisch verteilte Querbrüche.

G L I T E R A T U R

1. Miescher, F., Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen, Med. Chem. Untersuchungen (Hoppe-Seylers), Heft IV, (1871), 436 - 441
2. Altmann, R., Über Nucleinsäuren, Arch. für Anat. und Physiol., Physiologische Abt. (1889), 524 - 536
3. Karlson, P., Nucleinsäuren und Protein-Biosynthese, in: Biochemie, Georg Thieme Verlag, (1961), 2. Auflage, Kap. VII, 90 - 113
4. Watson, H.D. and Crick, F.H., Molecular structure of nucleic acids, Nature (London) (1953), 171, 737 - 738
5. Watson, J.D., Crick, F.H. and Wilkins, M.H., Molecular structure of desoxypentose nucleic acids, Nature (London) (1953), 171, 738 - 740
6. Avery, O.T., MacLeod, C.M. and McCarty, M., Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types (Inducing of transformation by a desoxyribonucleic acids fraction isolated from *Pneumococcus* type III), J. Exp. Med. (1944), 79, 137 - 158
7. Meselson, M., Stahl, F.W. and Vinograd, J., Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients, Proc. Nat. Acad. Sci. (1957), 43, 581 - 588

8. Belozersky, A.N. and Spirin, A.S., (in: E. Chargaff and J.N. Davidson, Ed., Chemistry of the nucleic acids of microorganisms) The nucleic acids, Acad. Press, New York, (1960), Vol. 3, 147 - 185
9. Burton, K., Desoxyribonucleic acid, Brit. Med. Bull., (1962), 18, 1, 3 - 8
10. Kleinschmidt, A.K., Lang, D. und Zahn, R.K., Über die intrazelluläre Formation von Bakterien-DNS, Z. Naturforschung, (1961), 16 b, 730 - 739
11. Kossel, A., Protamine und Histone (London), (1929), Seite 1 - 3, Die Entwicklung des Begriffes Protamine, III 17 - 20 Darstellung der Protamine IV 80 - 84 Über die biologische Bedeutung der Protamine und Histone
12. Marko, A. and Butler, G.C., The isolation of desoxyribonucleate with sodium dodecylsulfate, J. Biol. Chemistry, (1951), 190, 165 - 177
13. Kiefer, G., Kiefer, R., Zahn, G. und Zahn R.K., Über Desoxyribonucleinsäuren und Desoxyribonucleasen, der Einfluß von DNS und Nucleotiden auf die DNase-Wirkung am Seeigellei, Biochem. Z., (1961), 334, 49 - 57
14. Gierer, A. und Schramm, G., Die Infektiosität aus Tabakmosaikvirus, Z. Naturforschung, (1956), 11 b, 138 - 142

15. Zahn, R.K., Tiesler, E., Kleinschmidt, A.K. und Lang, D., Ein Konservierungs- und Darstellungsverfahren für Desoxyribonucleinsäure und ihre Ausgangsmaterialien, Biochem. Z., (1962), 336, 281 - 298
16. Marmur, J. and Doty, P. Heterogeneity in deoxyribonucleic acids, I. Dependence on composition of configurational stability of deoxyribonucleic acids, Nature (London), (1959), 183, 1427 - 1429
17. Sueoka, W., Marmur, J. and Doty, P., Dependence of DNA on Guanine-Cytosine, Nature (London), (1959), 183, 1429 - 1431
18. Schumaker, W.N. and Schachman, H.K., Ultracentrifugal analysis of dilute solutions Biochim. Biophys. Acta, (1957), 23, 628 - 639
19. Gehatia, M., Zahn, R.K. und Kleinschmidt, A.K., Über die Molekulargewichtsverteilung von Desoxyribonucleinsäure in der Ultrazentrifuge, Kolloid Z., (1960), 169, 162 - 168
20. Rubenstein, J., Thomas, C.A., Jr. and Hershey, A.D., The molecular weights of T_2 bacteriophage DNA and its first and second breakage products, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), (1961), 47, 1113 - 1122

21. Davison, P.F., Freifelder, D., Hede, R. and Levinthal, C., The structural unity of the DNA of T₂ bacteriophage, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), (1961), 47, 1123 - 1129
22. Cairns, J., An estimate of the length of the DNA molecule of T₂ bacteriophage by autoradiography, J. Mol. Biol., (1961), 3, 756 - 761
23. Hall, C.E. and Doty, P., A comparison between the dimensions of some macromolecules determined by electron microscopy and by physical chemical methods, J. Am. Chemical Soc., (1958), 80, 1269 - 1274
24. Hall, C.E. and Litt, M.H., Morphological features of DNA macromolecules as seen with the electron microscope, J. Biophys. Biochem. Cytology, (1958), 4, 1 - 4
25. Kleinschmidt, A. und Zahn, R.K., Über Desoxyribonucleinsäuren-moleküle in Proteinmischfilmen, Z. für Naturforschung, (1959), 14 b, 770 - 779
26. Kleinschmidt, A., Lineare Makromoleküle in Protein-Mischfilmen, III. Internationaler Kongreß für Grenzflächenaktive Stoffe, Köln, 1960, (1960), 2, 138 - 143
27. Lang, D., Hellmann, W., Kleinschmidt, A.K. und Zahn, R.K., Konfiguration und Längenverteilung von DNA-Molekülen in Lösung, im Druck

28. Kehler, H., Koch, A. und Tesser, K., Über die
Präparation von Suspensionen für das Über-
mikroskop im Ultraschallnebel, Z. Wiss. Mikros-
kopie,
(1956), 62, 521 - 524
29. Kleinschmidt, A., Lang, D und Zahn, R.K.,
Darstellung molekularer Fäden von Desoxyri-
bonucleinsäure, Naturwissenschaften,
(1960), 47, 16 - 17

Weitere benutzte Literatur

30. Alexander, R., Molecular structure of the nucleic acids, Rev. Mod. Physics,
(1959), 31, 191 - 199
31. Anfinsen, C.B., The molecular basis of evolution,
Wiley and Sons, New York, (London), (1960),
15 - 90: 1. Genes as determinants of heredity
2. The chemical nature of genetic material
3. The substructure of genes
164 - 185: Genes as determinants of protein
structure
32. Brown, G.L., Ribonucleic acid and bacterial genetics
in: Brit. Med. Bull.,
(1962), 18, 10 - 13
33. McElroy W.D. and Glass, B., The chemical basis of
heredity, J. Hopkins Press, Baltimore,
(1957)
34. Engström, A. and Finean, J.B., Biological ultra-
structure, Acad. Press, New York, 1958, Role of
nucleic acids,
260 - 285
35. Kahan, F.M., Purification and measurement of
microgram amounts of radioactive nucleic acids and
proteins from animal cells in tissue culture,
Analyt. Biochem.
(1960), 1, 107 - 120

36. Kuhn, W., in: Physiologische Chemie (Ed. Flaschen-
träger, B. und Lenhartz, E.), Springer-Verlag,
Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1951,
1, 151 - 159 Teilchengröße und Teilchengestalt
bei lyophoben Kolloiden,
1, 159 - 164 Lyophile Kolloide
37. Levinthal, C., Genetics and the role of nucleic
acids, Rev. Mod. Physics,
(1959), 31, 227 - 232
38. Leuthard, P., Die Nucleinsäuren, in: Lehrbuch
der Physiologischen Chemie, Walter De Gruyter & Co.,
Berlin,
(1957), 116 - 125
39. Peters, D., Substrukturen der Vaccine-Viren
im Elektronenmikroskop, in: Fifth International
Congress for Electron Microscopy, Philadelphia,
Acad. Press, New York,
(1962), Vol. 2, Artikel S-2
40. Reimer, L., Elektronenmikroskopische Unter-
suchungs- und Präparationsmethoden, Springer-Verlag,
Berlin, Göttingen, Heidelberg,
(1951),
41. Schramm, Die Biochemie der Viren, Springer-Verlag,
Berlin, Göttingen, Heidelberg,
(1954)

42. Weber, E., Grundriß der biologischen Statistik
für Naturwissenschaftler und Mediziner,
G. Fischer-Verlag, Jena 1948
43. Williams, R.C., Replication of nucleic acids,
Rev. Mod. Physics,
(1959), 31, 233 - 240
44. Zahn, R.K. und Kleinschmidt, A., Morphologie
und biologische Wirkungen von Desoxyribonuclein-
säuren und Desoxyribonucleasen, Acta Histochem.
Suppl. II,
(1959), 38 - 53

Am Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. A. K. Kleinschmidt für die Überlassung des Themas und für seine große Hilfsbereitschaft besonders danken, ebenso Herrn Dr. D. Lang und den Mitarbeiterinnen im elektronenmikroskopischen Laboratorium des Hygiene-Institus der Stadt und Universität Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. K. Herzberg).

L E B E N S L A U F

Ich, Warda Toba Rothschild, bin als Tochter des Dr. med. dent. Richard Rothschild und seiner Ehefrau Antonie geb. Roer am 20. Juli 1937 in Tel-Aviv/Israel -seinerzeit Palästina- geboren.

Meine Heimatanschrift ist: Givataim/Israel, Borochovstr. 44 A.

Von 1943 - 1951 besuchte ich in Givataim/Israel die Volksschule, ab 1951 - 1954 das Gymnasium in Givataim und ab 1954 - 1955 das Gymnasium in Tel-Aviv. Ich legte dort im Dezember des gleichen Jahres das Abitur extern ab. Anschließend war ich in der Praxis meines Vaters tätig.

Ab Sommer-Semester des Jahres 1957 studierte ich Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main. Dort bestand ich im Sommer 1959 die zahnärztliche Vorprüfung und am 6. August 1962 das zahnärztliche Staatsexamen.

Ab Januar 1963 war ich 1 1/2 Monate Assistentin eines Zahnarztes. Im April habe ich einen Wochenkursus über Kinderzahnheilkunde am Eastman Dental Hospital in London absolviert.

Warda Rothschild

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Über Längenmessungen der Desoxyribonucleinsäure

im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. A.K. K l e i n s c h m i d t mit Unterstützung durch Herrn Dr.D. L a n g und den Mitarbeitern im elektronenmikroskopischen Laboratorium ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main, den 15. Juni 1963

Wolfgang S. H. L. L. L.

Meine akademischen Lehrer waren

<u>Fach</u>	<u>ak. Lehrer</u>
Anatomie und Histologie etc.	Frick, Kummer, Ortmann, Starck
Allgemeine Chirurgie	Weber, Westermann
Chemie	Ried, Royen, Wieland
Geschichte der Medizin	Artelt
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde	Rossberg
Haut- und Geschlechts- krankheiten	Landes
Hygiene	Kleinschmidt
Innere Medizin	Frey, Jürgens, Martin
Kiefer-Orthopädie	Koller
Latein	Schlerath
Pathologie	Kahlau, Sandritter, Zimmer- mann
Pharmakologie	Greeff, Westermann
Physik	Czerny, Dänzer
Physiologie	Greven, Wezler
Physiologische Chemie	Felix, Hübener, Zahn
Prothetik und zahn- ärztliche Werkstoffkunde	Kuck
Rechts- und Berufs- kunde	Luff, Kreter
Zahnheilkunde (Zahn-, Mund- und Kieferkrank- heiten und Zahnerhaltung) und spezielle Chirurgie	Hauser, Kreter, v. Reckow
Zoologie	Giersberg

